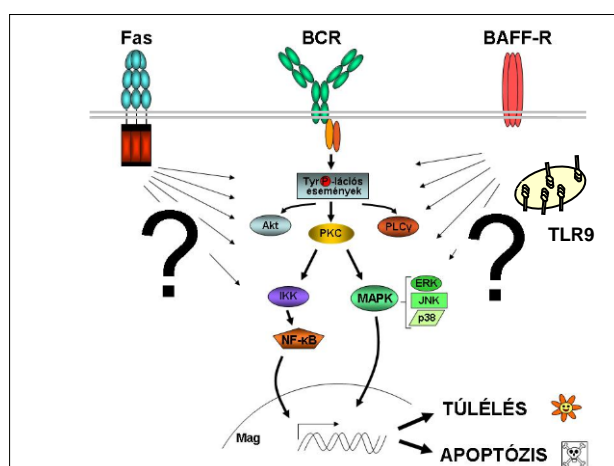


OTKA 60760

2007-2010

Záróbeszámoló

Dr. Sármay Gabriella



A csontvelőben zajló B-sejt fejlődés alatt a megjelenik a még éretlen B-sejtek membránján az antigén fajlagos megkötésére képes, csak a B-limfocitára jellemző membrán immunglobulin molekula, a B-sejt receptor (BCR). A B-sejtek jelentős része már a fejlődése kezdetén elpusztul, mert receptoruk nagy affinitással reagál a csontvelői mikrokörnyezetben a szervezet saját struktúráival. A saját antigént fel nem ismerő B-sejtek kivándorolnak a csontvelőből, és betelepítik a másodlagos nyirokszerveket, ahol további szelekciós lépések mennek végbe az autoreaktív sejtek kiszűrésére. A szelekció során meghatározó szerepet játszanak a B-sejt receptorok (BCR) mellett a tumor nekrosis faktor (TNF) receptorok családjába tartozó B-sejt aktiváló faktor receptorok (BAFF-R), a programozott sejthalált kiváltó, szintén a TNF receptor családba tartozó Fas/CD95 molekula, valamint -feltehetően- a Toll-szerű receptorok, különösen az endoszómák membránján kifejeződő TLR9, amely bakteriális, vagy apoptotikus sejtekből felszabaduló, hipometilált DNS felismerésére és megkötésére képes. Az említett receptorok által stimulált jelpályák között kialakuló kölcsönhatások összessége határozza meg a sejt sorsát: azt, hogy a programozott sejthalál (apoptózis), vagy éppen a sejtek túlélése és/vagy szaporodása következik be. Az autoimmun betegségek patogenezise során egyes jelpályák „kisziklása” hibás szabályozáshoz, és így az autoreaktív sejtek túléléséhez vezethet.

Célunk a BCR, a TLR9, a BAFF receptor 3 (BR3) és Fas együttes jelkövetítésének tanulmányozása, a jelpályák közötti együttműködés módjának felderítése volt egészséges egyének és autoimmun betegek B-sejtjeiben. Vizsgálatunk tárgyául olyan szisztémás autoimmun betegséget, a reumatoid arthritist (RA) választottuk, ahol a B-sejtek kulcsszerepe és az autoreaktív ellenanyag termelés bizonyított, és a betegek vérmintái is rendelkezésre állnak viszonylag nagy mennyiségben.

1. A BCR, BR3 ÉS A TLR9 ÁLTAL STIMULÁLT JELEK HATÁSA B-SEJTEK CD95/FAS-INDUKÁLT APOPTÓZISÁRA

Először perifériás vérből tisztított B-sejteken vizsgáltuk a különböző receptorok expresszióját. A B-sejteket Easy-Sep technológiával (RosetteSep, StemCells Technology, US) izoláltuk, a sejtek tisztasága CD19/CD3 kettős fluoreszcencia alapján áramlási citométerrel mérve >95% volt. A B-sejtek kb. 90%-án jelen volt a BAFF-R, a CD10 pozitív tranzicionális-, és a CD27 pozitív memória B-sejteken egyaránt. Ezzel szemben a Fas a vérből tisztított B-sejtek mintegy 5-6 %-án fejeződik ki, a CD10+ sejtek Fas negatívak, míg a memória B sejtek egy része Fas pozitív. A B sejtek 2-3%-a expresszálja egyidejűleg a BAFF-R-t és a Fas molekulát is. Az eredmények alapján világossá vált, hogy primer B sejteken nehezen vizsgálható a Fas és a BCR, ill. a BAFF-R által indukált jelpályák közötti együttműködés, amelynek valószínűleg a germinális centrumban zajló szelekciós folyamatokban lehet szerepe. Ezért számos B-sejtvonal vizsgálata alapján kiválasztottuk a receptorok együttműködésének vizsgálatára legalkalmasabb emberi B sejtvonalat, az EBV transzformált emberi B limfocita, SKW6.4-t.

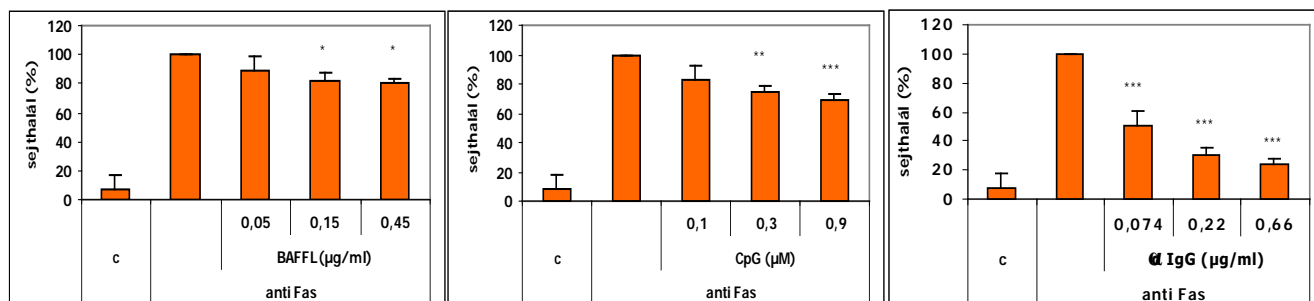
A BCR, BAFF-R és Fas receptor együttműködését vizsgálva az SKW6.4 sejteken a következő eredményeket kaptuk:

- BAFF fehérjével, vagy BAFF specifikus ellenanyaggal 24h-n át előkezelt sejtek ellenállóbbak a Fas-közvetített apoptózissal szemben, a BAFF - a BCR keresztökötéshez hasonlóan - megmenti a B-sejteket a Fas-indukált apoptózistól.
- A BAFF receptor közvetítette túlélőjel nem szinergisztikus a BCR-en keresztül, apoptózistól megmentő szignállal, és független a Bcl-xl expressziójától, ugyanakkor *de novo* fehérjesszintézist igényel.

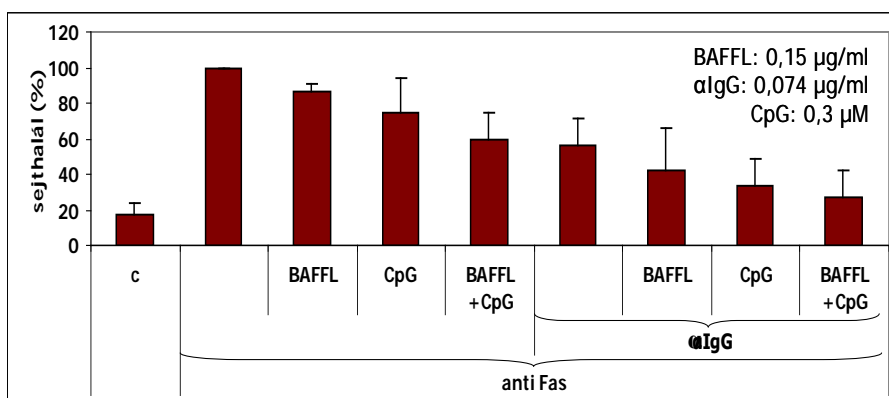
- A Fas receptor aktiválása az apoptózisban is szerepet játszó JNK és a p38 MAP kinázok foszforilációját váltja ki, melyet a BAFF előkezelés gátolni képes.

(Hancz A, Herincs Z, Neer Zs, Sarmay G, Koncz G. *Integration of signals mediated by B-cell receptor, B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) and Fas (CD95).* *Imm Letters* 116: 211–217 (2008)).

Az SKW6.4 emberi B sejtvonal mérsékelten volt csak érzékeny a Fas-indukált apoptózisra, ezért a jelenség további vizsgálatát A20 egér B sejtvonalon végeztük. Az A20 sejtek kifejezik mind a négy receptort és alkalmas modellnek látszanak a BCR, Fas, TLR9 és BAFF-R közötti együttműködés vizsgálatára. Az apoptózissal elpusztult sejtek mennyiségét a subG1 fázis meghatározásával, a 70%-os etanolos fixálást, a Na-citrátos mosást és propidium jodid festést követően áramlási citofluoriméterrel mértük. A rekombináns egér BAFF fehérjével, a TLR agonista CpG oligonukleotiddal és α IgG-vel történt stimulációt (1 óra 37°C) követően anti-Fas ellenanyaggal váltottuk ki az apoptózist, amelynek mértékét 2 és fél óra elteltével a subG1 fázisban levő sejtek aránya alapján határoztuk meg.

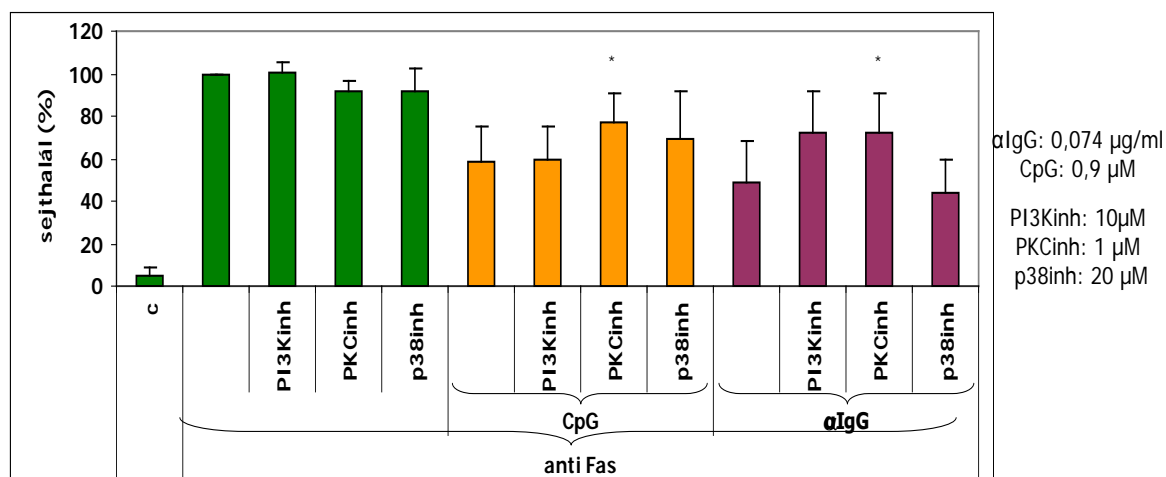


1. Ábra. A BAFF, a TLR9 agonista, CpG, és az anti-IgG dózistól függően gátolja az A20 sejtek Fas-indukált apoptózisát. A20 sejteket előkezeltünk különböző koncentrációban BAFF-fal, CpG-vel, illetve anti-IgG-vel, majd 1 óra elteltével anti-Fas ellenanyaggal inkubáltuk további 2 és fél órát. Öt független kísérlet átlaga.



2. Ábra. BAFF-fal, CpG-vel és α IgG-vel történő kostimuláció hatása a Fas-közvetített apoptózisra. A BAFF, CpG, és a BCR-en keresztüli stimuláció (anti-IgG) egymás hatását kölcsönösen erősítve megmentik az A20 sejteket a Fas-indukált sejthaláltól. A sejteket 0.3 µM CpG, 0.15 µg/ml BAFF és 0.074 µg/ml anti-IgG előkezelés után Fas-specifikus ellenanyaggal kezeltük, a subG1 populációt 2.5 óra eltelté után határoztuk meg. Három független kísérlet átlaga.

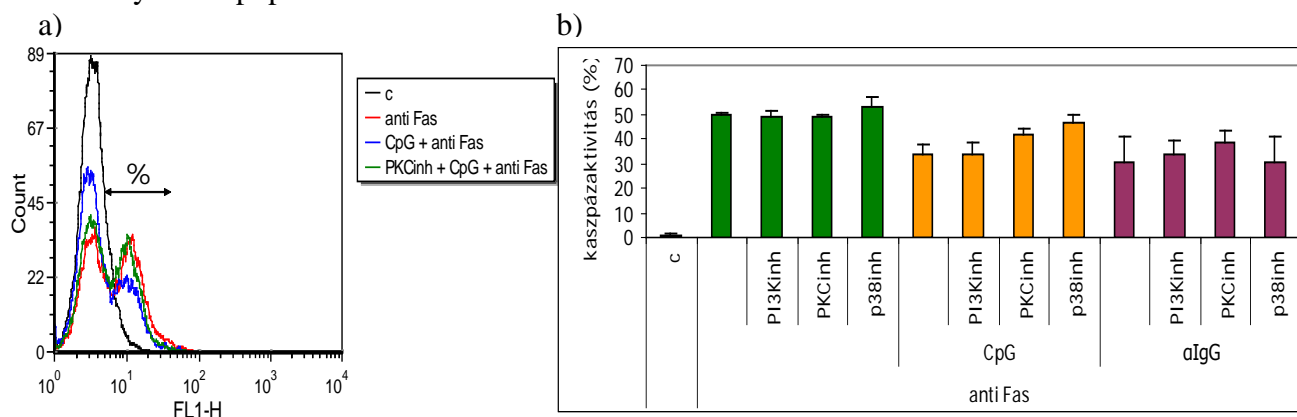
A sejthalálból való megmentés bekövetkezhet a különböző stimulusok által kiváltott anti-apoptotikus jelek hatására, többek között az apoptózisért felelős kaszpázok valamelyikének foszforiláció útján történő inaktiválásával. Kimutatták, hogy a kaszpáz 3 és a kaszpáz 9 foszforilációja gátolja az enzimek aktivitását (Kurokawa and Kornbluth 2009). Megvizsgáltuk különféle szerin kinázokat közvetve vagy közvetlenül gátló ágensek hatását az A20 B-sejtek Fas-indukált apoptózisból való megmenekülésére.



3. Ábra. PI3-K, PKC és p38 inhibitorok hatása a CpG és αIgG által indukált túlélésre. Az inhibitorokkal (10µM PI3K, 1 µM PKC és 20 µM p38 inhibitor) 1 órával történt előkezelés után adtuk a sejtekhez a túlélést segítő stimulusokat (CpG vagy anti-IgG), majd 1 órával ezután az anti-Fas ellenanyagot. Három független kísérlet átlaga.

A PKC inhibitor gátolta az A20 sejtek Fas-indukált sejthalálból való megmenekülését mind a CpG-, mind az anti-IgG-kezelt mintákban, míg a p38 inhibitor csak a CpG által kiváltott, a PI3-K inhibitor csak a BCR által kiváltott túlélést csökkentette.

A továbbiakban a kaszpáz aktivitást mintáinkban egy általános kaszpáz szubsztrát hasítása alapján mértük. A sejtmembrán permeábilis D2-R110 szubsztrát hasításakor a bisz-L-aszparaginsav-amid-hoz kötött rodamin 110 felszabadul, aminek következtében az aktív kaszpázzal rendelkező sejtek fluorescenciája jelentősen megnő. A fluorescens jelet adó sejtek száma arányos az apoptózis mértékével.



4. Ábra. A PI3-K, PKC és p38 gátlószerek hatása az A20 B-sejtek Fas-indukált apoptózisból való megmenekülésére CpG és anti-IgG stimulációt követően, az aktív kaszpáz enzimekkel rendelkező sejtek arányának meghatározása alapján. a) Egy

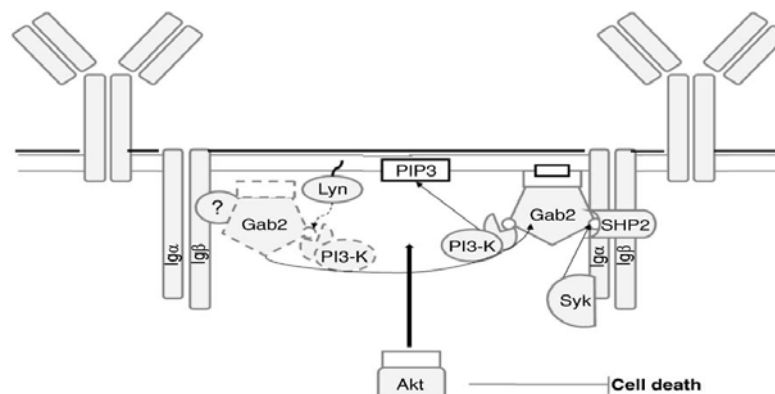
tipikus áramlási citometriás mérés hisztogramja. A kaszpáz pozitív sejtek száma a CpG stimulus hatására csökkent, amit a PKC inhibitor kivédett. b) Három kísérlet átlaga, az oszlopok a kaszpáz pozitív sejtek %-os arányát mutatják.

A fenti összesített eredményeink alapján (bár az utóbbi kísérlet még további méréseket igényel) azt mondhatjuk, hogy a B-sejtek CpG által kiváltott megmentése a Fas-indukált sejthalálból PKC- és p38 MAPK-függő, de nem függ a PI3K aktivitásától. A BCR által indukált jel -szemben a CpG-közvetített megmentéssel- mind PKC, mind PI3K gátlókkal csökkenhető volt, de a p38 inhibitor hatástalannak bizonyult. A BAFF előkezelés viszonylag kevésbé mentette meg a sejteket az apoptózistól, ezért az inhibitorok hatását erre nem vizsgáltuk.

A BCR és a CpG tehát részben átfedő, (PKC) részben eltérő (PI3K vagy p38) jelpályák aktivációján keresztül fejtheti ki apoptózist gátló hatását, feltehetően a kaszpáz 3 foszforilációja, és ezt követő inaktivációja útján. A Fas-közvetített sejthalál kulcsszerepet játszik a potenciálisan autoreaktív sejtek elpusztításában. Feltételezzük, hogy a BCR és TLR9 által kiváltott, általunk leírt mechanizmusnak szerepe van az autoreaktív B-sejtek sejthalálból való megmenekülésében, így a tolerancia áttörésében.

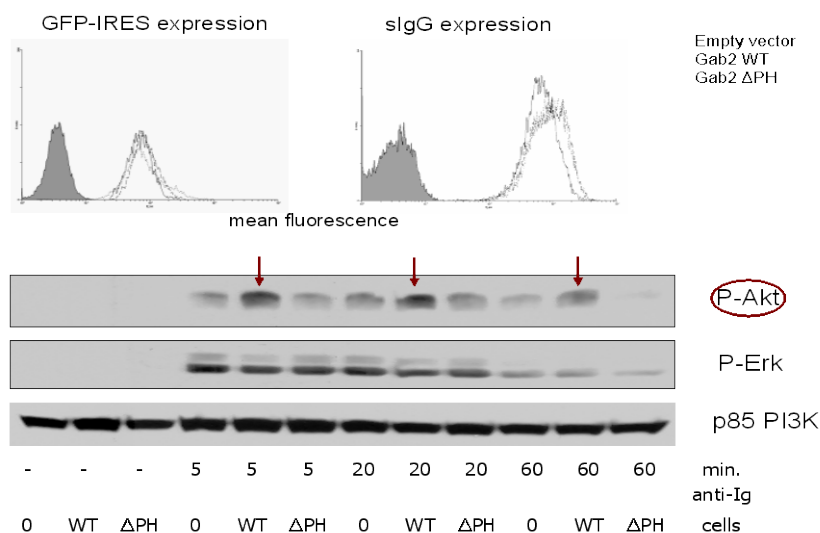
A továbbiakban az adapter fehérje, a Grb2 associated binder 2 (Gab2) szerepét vizsgáltuk a BCR által stimulált sejttaktiváció és a Fas-indukált sejthalál során. Miután a PI3-K gátlása csökkentette a BCR által a Fas-indukált sejthalálból való megmentést, megvizsgáltuk, hogy a PI3-K aktivitását szabályozó Gab2 adapter fehérje játszik-e szerepet ebben a folyamatban. Ismert, hogy a Gab adaptor fehérje család tagjai, a Gab1 és a Gab2, tirozinon foszforilált motívumai dokkoló helyül szolgálnak a foszfatidil inozitol 3-kináz (PI3-K) p85 alegysége és az SHP-2 foszfatáz számára, amelyek SH2 doménjeiken keresztül kötődnek az adapterhez (Gu, Botelho et al. 2003). A Gab1 pozitív visszacsatolással szabályozza a PI3-K aktivitását, mivel az adapter pleksztrin homológ (PH) doménje kötődik a PI3-K termékéhez a foszfatidil inozitol 3,4,5 triszfoszfáthoz (PIP3) a sejtmembránban. Ez a PI3-K – PDK – Akt útvonal aktiválásán keresztül a sejtek túlélését segíti elő. A Gab adaptor fehérjék szerepet játszanak az SHP-2 foszfatáz, és ezen keresztül az Erk aktiválódásában is (Rodrigues, Falasca et al. 2000; Shi, Yu et al. 2000).

Egér B sejtekben elsőként jellemeztük a Gab2 funkcióját, megállapítottuk, hogy a Gab2 az konstitutívan kapcsolódik a BCR Igα/Igβ dimerjéhez, majd a receptor keresztkötését követően az aktivált Lyn kináz által foszforilálódik. A Gab2 Lyn által foszforilált motívuma felelős a p85 kötődésért és ezt követően a PI3-K aktiválódásáért. Ezután PH doménjével a membránhoz stabilan kötődő Gab2 egy másik, az SHP-2 foszfatázt kötő motívuma a Syk kináz által foszforilálódik. Az eredményeink alapján felállított modellt az alábbi ábra szemlélteti.



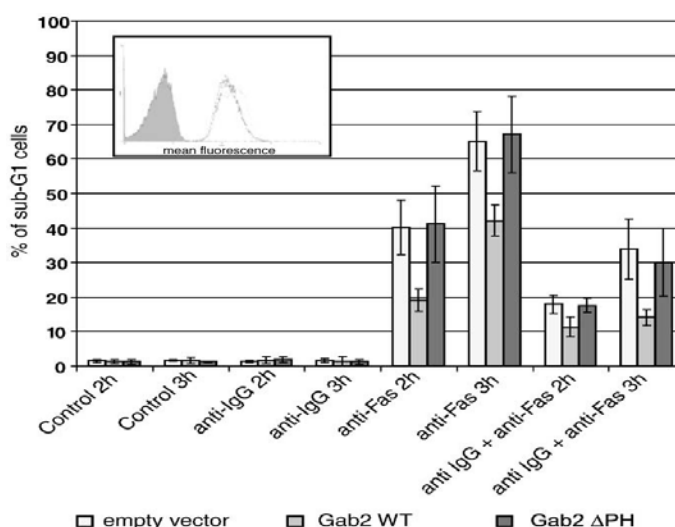
5. Ábra. A Gab2 B-sejtekben betöltött szerepének hipotetikus modellje

Megvizsgáltuk, hogy a Gab2-t nagy mennyiségben kifejező, Gab2-vel transzfektált, A20 B-sejtek ellenállóbbak-e a Fas-közvetített sejthalálnak. A20 sejteket transzfektáltunk vad típusú és PH domén nélküli (Δ PH) Gab2-vel, majd vizsgáltuk az Akt és az Erk aktiválódását, valamint a transzfektált sejtek Fas-indukált sejthalálra való képességét.



6. Ábra. Akt és Erk foszforiláció az idő függvényében Gab2-vel transzfektált A20 B-sejtekben anti-IgG hatására. A felső hisztogramok a vektor bejutását (GFP-IRES), illetve a BCR expresszióját mutatják a transzfektált sejtekben.

A teljes Gab2-vel transzfektált A20 sejtek nagyobb mértékű anti-IgG által kiváltott Akt foszforilációt mutattak, a nem transzfektált sejtekhez képest, míg az Erk aktiváció mértéke nem változott. A PH domén nélküli Gab2-t kifejező sejtek a nem transzfektált sejtekéhez hasonló Akt foszforilációt mutattak. A továbbiakban a Gab2 expresszió Fas-indukált apoptózisra kifejtett hatását néztük meg.



7. Ábra. A vad Gab2 fokozott kifejeződése a transzfektált A20 sejtekben megmenti a sejteket a Fas-indukált sejthalálból, és erősíti az anti-IgG túlélést fokozó hatását is, míg a PH domént nem tartalmazó Gab2 hatástalan.

A vad típusú Gab2 jelenlétében jelentősen csökkent az apoptotikus sejtek aránya, míg a PH domént nem tartalmazó Gab2-vel transzfektált sejtekben nem. Az anti-IgG stimulus megmentette a sejtek jelentős részét a sejthalálból, és ez a fokozott Gab2 kifejeződés mellett még erősebbnek bizonyult, míg a PH domén nélküli Gab2 itt is hatástalan volt. Ez arra utal, hogy a Gab2 sejtmembránhoz való horgonyzása a PIP3-PH doménon kapcsolaton keresztül elengedhetetlen a Gab2 funkciójának betöltéséhez.

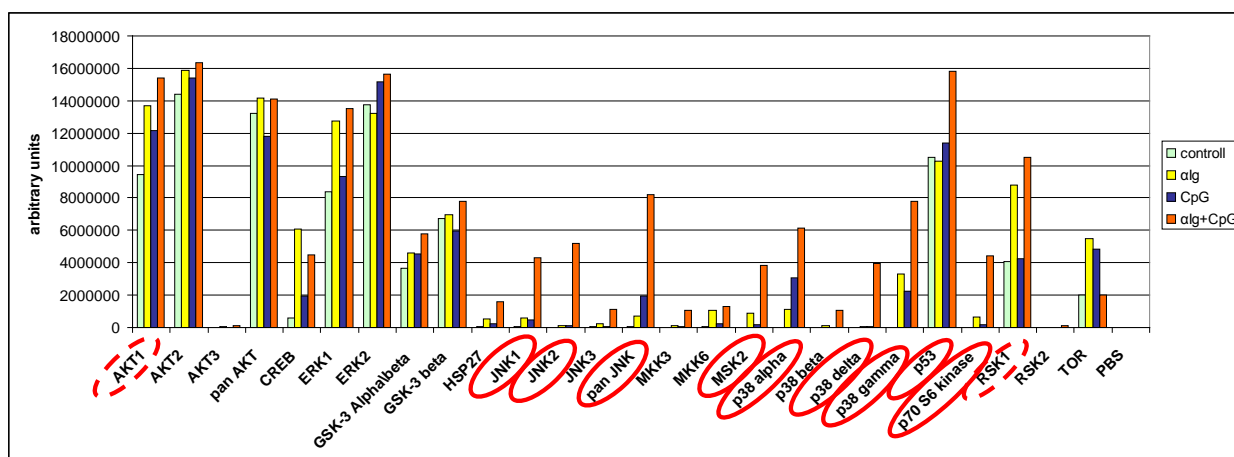
Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a fokozott Gab2 expresszió megmenti a B-sejteket a Fas-indukált sejthalálból, továbbá, fokozza a BCR által történő apoptózis gátlást, ami feltehetőleg a Gab2 - PI3-K - Akt jelpálya aktiválásának köszönhető. Ez egybeesik korábbi eredményünkkel, ami szerint a B-sejtek Fas-indukált sejthalálból való megmentése a BCR-en keresztül történő stimuláció hatására PI3-K gátló jelenlétében nem megy végbe.

(Maus M, Medgyesi D, Kövesdi D, Csuka D, Koncz G, Sármay G. Grb2 associated binder 2 couples B-cell receptor to cell survival. Cell. Signal. 21:220-227, 2009)

2. A BCR, BAFF-R ÉS TLR9 ÁLTAL INDUKÁLT JELEK INTEGRÁCIÓJA B-SEJTEKBEN

A munka második részében célunk annak feltérképezése volt, hogy a BCR, a BR3 és a TLR9 receptorok által kiváltott jelek hogyan kooperálnak emberi B-sejtekben, valamint annak feltárása, hogy milyen jelátviteli molekulákon keresztül megy végbe a szignál integráció?

Elsőként a BCR, BR3 és a TLR9 által stimulált ismert jelpályákat hasonlítottuk össze az irodalmi adatok alapján, annak megállapítására, hogy mely molekulák lehetnek közösek ezekben. A mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) jelpályája valamennyi esetben aktiválódik, így ez jó kiindulópontnak tűnt. A foszforilált MAP kinázokra specifikus fehérje microarray segítségével mértük fel a számításba vehető molekulákat. Először a BJAB, emberi Burkitt limfoma eredetű sejtvonalon vizsgáltuk a BCR-en, a TLR9-en és a két receptoron keresztül egyszerre stimulált sejtek lizátumában az aktiválódott (foszforilált) kinázokat.

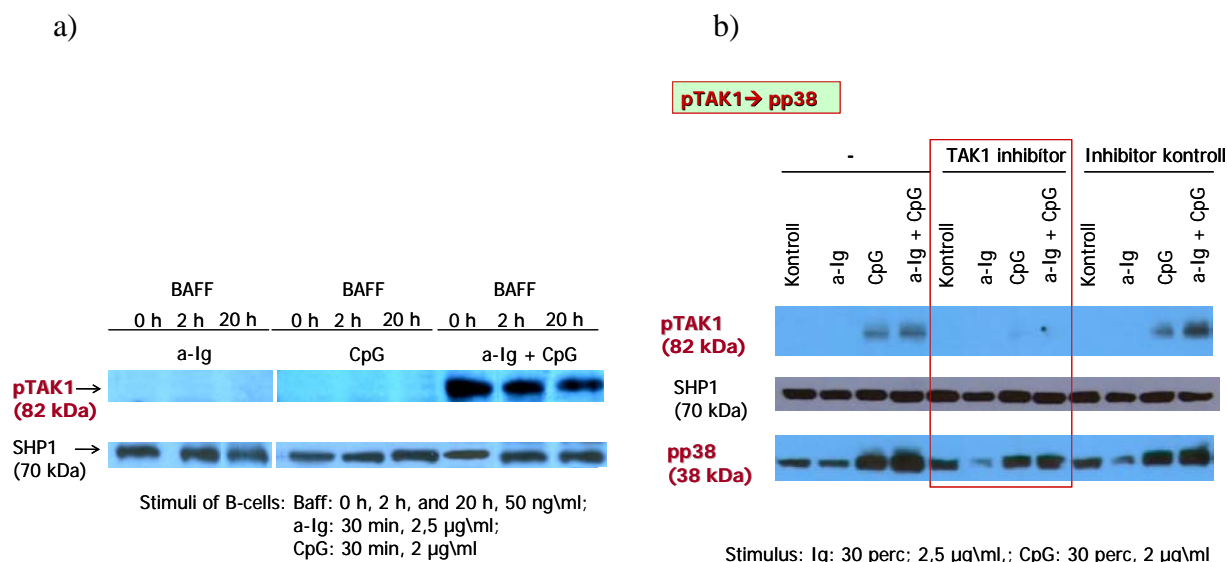


8. Ábra. Foszfo-MAPK array (Proteome Profiler Phospho-MAPK array (R&D ARY002-B). Kezeletlen, anti-Ig-vel, CpG oligonucleotiddal és mindkét stimulussal együtt 20 percig aktivált BJAB sejteket szolubilizáltunk, és a lizátum mintákat hasonlítottuk össze a gyártó utasításai szerint, a foszfo-kinázokat felismerő ellenanyagokkal fedett microarray membránon. A membránokat a kemoluminescenciát adó szubsztrát

hozzáadása után hívtuk elő, a kapott foltokat denzitometráltuk. A GenePixPro 6.0 program segítségével értékeltük az eredményeket.

A legnagyobb mértékű együttműködést az anti-Ig és a CpG által stimulált jelek között a JNK, a p38 MAPK és a MSK2-nél találtuk, és a kettős aktiváció emelte még a p70S6 kináz, a p53, és kissé fokozta az Akt1, valamint az RSK1 foszforilációját is. Ismert, hogy az MSK2, a p70S6 kináz, és a p53 is a p38 MAPK szabályozása alatt állnak, így **a p38 MAPK-nak kiemelt szerepet tulajdonítunk a jelpályák közötti együttműködésben.**

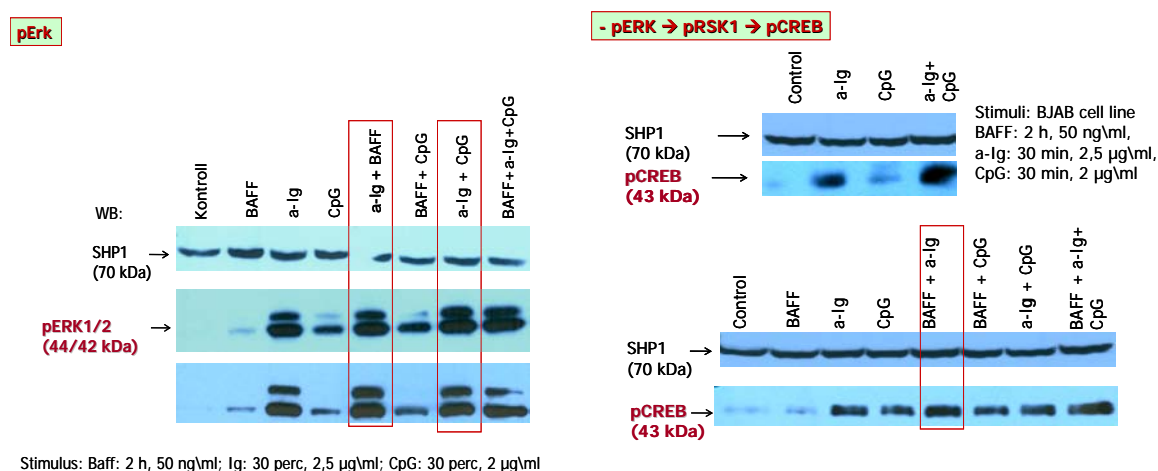
A MAP kináz kaszkád aktiválását a MAP3K indítja el, ezek egyike az MAP3K7, más néven TGF β aktivált kináz, a Tak1. Az irodalmi adatok azt mutatták, hogy a Tak1 szerepel a BCR és a TLR9 jelpályában, szerepe van a p38 szabályozásában is. Ezért megvizsgáltuk a Tak1 aktivációját anti-Ig, CpG, BAFF és az együttesen adott jelek hatására, Western blot technikával, a foszforilált kinázokra specifikus ellenanyag alkalmazásával. Ezekben a kísérletekben egészséges véradók véréből RosetteSep koktéll segítségével (StemCell Technologies, US) izolált B-sejteket használtunk, ezek tisztasága 85-90 % volt.



9. Ábra. a) A Tak1 és a p38 aktiválódása a BCR-en, TLR9-en, BR3-on keresztül érkező jelek, és az együttes stimuláció hatására. b) A Tak1-re specifikus inhibitor (5Z-7-oxozeaenol) ill. az inaktív kontroll inhibitor hatása a Tak1 és a p38 foszforilációra. A mintafelvétel egyenletességét az SHP1 előhívása mutatja.

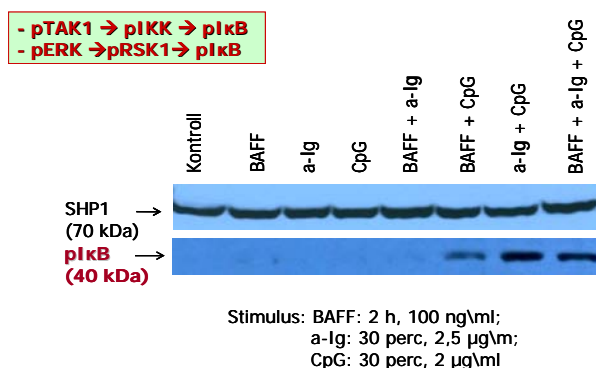
A Tak1 foszforilációját az anti-Ig és CpG nem, illetve csak gyengén aktiválta, míg a két szignál együttesen erős Tak1 foszforilációt váltott ki B-sejtekben (9. ábra). A BAFF nem aktiválta ezt az útvonalat. Az optimális stimulációs idő 30 perc, de a foszforiláció stabilan megmarad még 20 h elteltével is. A Tak1-nek ismert specifikus inhibitora az 5Z-7-oxozeaenol. Ennek segítségével bizonyítottuk, hogy valóban a Tak1 a közös célpontja mind a BCR-en mind a TLR9-en keresztül elinduló jelpályának, ráadásul szinergikus együttműködés figyelhető meg e receptorok között a Tak1 foszforilációt tekintve. A módosított szerkezetű inaktív inhibítort használtuk kontrollként, amely valóban hatástalanak bizonyult. A Tak1 inhibitor gátolta a p38 MAPK foszforilációját is, amely szintén fokozott aktivációt mutatott a BCR és a TLR9 együttes stimulációjakor. Ez arra utal, hogy a **Tak1-p38 jelpálya kiemelt szerepet játszik a BCR és a TLR9 együttműködése során.**

A továbbiakban megvizsgáltunk egy másik, az Erk- RSK- CREB útvonalat is. Az Erk foszforilációja kissé fokozódott az anti-Ig - BAFF és az anti-Ig – CpG stimulusok hatására, míg a BAFF és a CpG magában gyenge jelet adott. Az Erk a riboszomális S6 kinázon keresztül (RSK1) a CREB transzkripciós faktort aktiválja, amely aktivációs gének átírását indítja el. A BJAB sejtekben vizsgálva együttműködést láttunk a BCR és a TLR9 között, míg primer B-sejtekben ezt nem tudtuk kimutatni, ezzel szemben itt a BCR és a BR3 együttes stimulációja után kissé emelkedett CREB foszforilációt találtunk az egyszeres stimulusokhoz képest (10. ábra).



10. Ábra Az Erk és a CREB foszforilációja BCR, BAFF, CpG oligonukleotiddal, illetve kombinált stimulusok hatására. A mintafelvitel egyenletességét az SHP1 előhívása mutatja.

A BAFF-ról ismert, hogy az NFκB-t mind a klasszikus, NEMO-függő (NFκB Essential Modulator), mind az alternatív, NEMO-független úton (Bossen and Schneider 2006), míg a BCR a NEMO-IKK-n (Inhibitor κB Kináz) keresztül, a klasszikus úton aktiválja. Megvizsgáltuk az IκB foszforilációját is, amely előfeltétele az NFκB sejtmagba jutásának, és a génátírási folyamatok elindulásának. Ezen a szinten a TLR9 és a BAFF-R valamint a TLR9 és a BCR között találtunk együttműködést, amit a fokozott IκB foszforiláció mutatott. Az együttműködés szinergikusnak tűnik, az egyszeres stimulusok nem váltanak ki kimutatható IκB foszforilációt (11. ábra).



11. Ábra. Az IκB foszforilációja BCR, BR3 és TLR9, valamint a kombinált stimulációk hatására. Az egyenletes mintafelvitelt a gélre a kontrollként alkalmazott SHP1 előhívása mutatja.

A BCR, BAFFR (BR3), TLR9 jelpályák közötti együttműködés vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket összegzi a következő táblázat.

Kostimuláció:	Tak1	p38	Erk	CREB	IκB/ NFκB
BCR+BAFFR	-	-	+	+	-
BAFFR+TLR9	-	-	+/-	-	+++
BCR+TLR9	+++	+++	+	+	+++

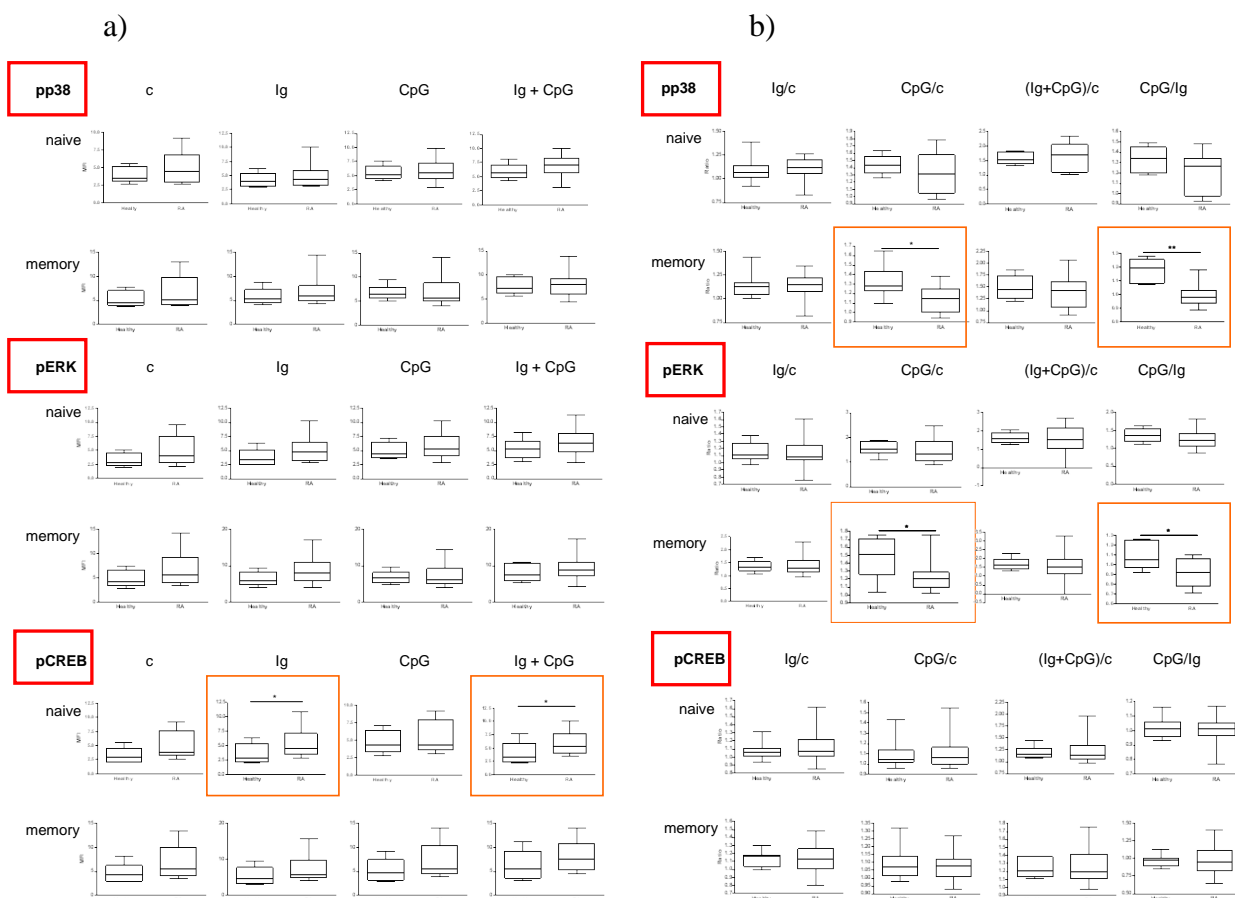
Eredményeink szerint a **BCR és a TLR9 között a TAK1 - p38 útvonalon alakul ki erős szinergia, míg a TLR9 mind a BAFFR-ral, mind a BCR-rel együtt stimulált jelei az NFκB útvonalon fejtik ki a hatásukat. Ezek a ko-stimuláló jelek csökkenthetik a B sejtek aktivációs küszöbét, esélyt adva az antigént kis affinitással kötő B sejteknek a túlélésre, és a további fejlődésre, megalapozva ezzel az autoimmun betegségek kialakulásának lehetőségét.** Ezek az adatok arra utalnak, hogy a Tak1 fontos gyógyszer-célpont molekula lehet új típusú terápiás eljárások fejlesztése során, szisztémás autoimmun betegségekben.

3. A BCR ÉS A TLR9 EGYÜTTMŰKÖDÉSE RHEUMATOID ARTHRITISES (RA) BETEGEK B-SEJTJEIBEN

Az eredetileg SLE betegekre tervezett vizsgálatokat RA betegek B-sejtjein végeztük. RA betegekből nagyobb beteganyag állt rendelkezésre, és a vérminták szállításának logisztikája könnyen megoldható volt. Az RA világszerte előforduló szisztémás autoimmun betegség 1% körüli prevalenciával. Bár a betegség háttere még mindig ismeretlen, számos rizikófaktort azonosítottak már. Ahogy a legtöbb autoimmun betegség, úgy a RA is gyakrabban fordul elő nőkben (3:1 arány), felhíva a figyelmet a nemi hormonok szerepére. A genetikai vizsgálatok bebizonyították, hogy a genetikai hajlam a HLA-DR locuson kódolt. Emelett nyilvánvaló, hogy bizonyos környezeti tényezők, úgy mint dohányzás, stressz, valamint bakteriális fertőzések szintén növelik a betegség kialakulásának valószínűségét (Gabriel 2001). A RA-t az ízületi szövet és membrán gyulladása jellemzi, amelyen aktivált leukociták, neutrofil granulociták, CD4+ T-sejtek, B-sejtek és monociták jutnak át. Ezek mellett az ízületben található fibroblasztok is részt vesznek a betegség kialakításában (Firestein and Zvaifler 2002). Újabban a B-sejteknek fontos szerepet tulajdonítanak a betegség patomechanizmusában, a betegek szérummintái kb. 80 %-ában a citrullinált saját-fehérjék elleni autoreaktív ellenanyagokat (ACPA) mutattak ki. Feltételezésünk szerint a periférián végbemenő hibás negatív szelekciónak szerepe lehet az autoreaktív B-sejtek életbenmaradásában, és ezt befolyásolhatja a BCR és a metilálatlan DNS megkötésére képes TLR9 között kialakuló, az előző fejezetben bemutatott ko-szignalizáció.

Célunk a ko-szignaling összehasonlítása volt RA betegek és egészségesek B-sejtjeiben. Miután a betegek vérmintáiból nem lehetséges a Western blot technikához megfelelő mennyiségű B-sejt izolálása, vizsgálatainkat perifériás mononukleáris sejteken végeztük multiparaméteres áramlási citometriás mérésekkel, a CD20 és CD27 pozitív sejtekre (memória B-sejtek) vagy a CD20 pozitív, CD27 negatív sejtekre (naív B-sejtek) kapuzva. Az előző eredményeink alapján kiválasztottuk a vizsgálni kívánt jelátviteli fehérjéket, így a p38 MAPK, az Erk és a CREB foszforilációját hasonlítottuk össze egészséges egyének és RA

betegek naív és memória B-sejtjeiben a foszforilált molekulákra specifikus ellenanyagokat alkalmazva. Eredményeinket a 12. ábra foglalja össze.



12. Ábra. „Foszfó-flow” vizsgálat egészségesek és RA betegek B-sejtjein. A p38, Erk és CREB foszforiláció mértékének összehasonlítása anti-Ig-, CpG- és anti-Ig+CpG-stimulált mintákon. Az a) oszlop az átlag fluoreszcencia értékek összehasonlítását mutatja, a b) oszlopban a jelölt minták (aIg/control, CpG/control, aIg+CpG/control, CpG/aIg átlag fluoreszcencia értékeinek hányadosát ábrázoltuk.

A vizsgálat 10 RA beteg és korban, nemben hozzáillő 10 egészséges egyén B-sejtjeinek összehasonlítása, a statisztikai elemzést Mann-Whitney próbával végeztük. A narancsszínű keretek a szignifikáns különbségeket jelzik (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Az átlag fluoreszcencia összehasonlítása azt mutatta, hogy az anti-Ig és anti-Ig+CpG stimulált mintákban a CREB foszforilációja szignifikánsan magasabb RA betegek naív B-sejtjeiben mint az egészségesekben. A hányadosok összehasonlítása azt mutatta, hogy a CpG-stimulált p38 és Erk foszforiláció a betegek memória B-sejtjeiben alacsonyabb a kontrol, egészséges mintákéhoz képest.

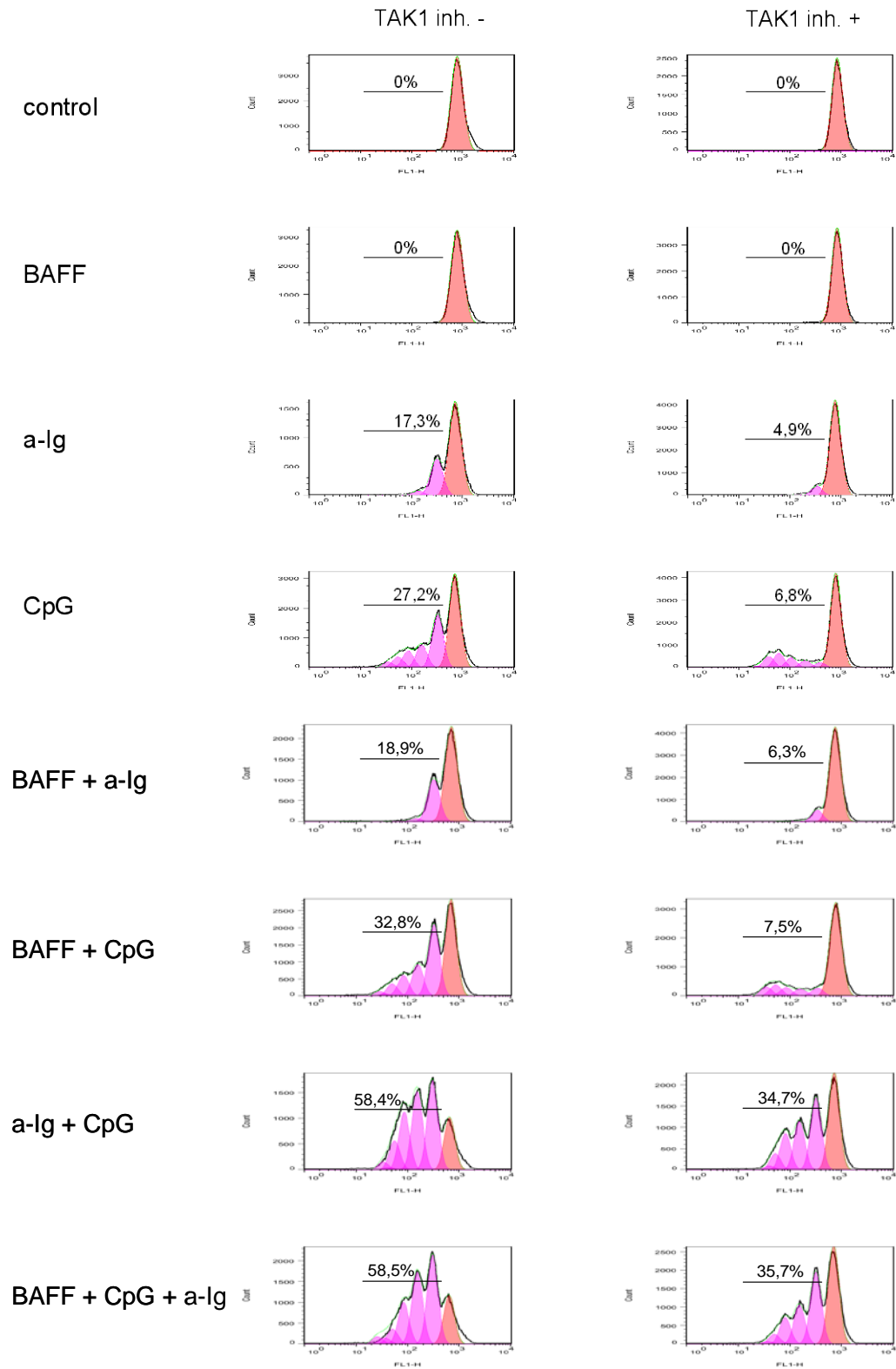
A minták viszonylag alacsony száma miatt messzemenő következtetést mindebből még nem tudunk levonni, de azt mondhatjuk, hogy a betegek naív B-sejtjei kissé jobban stimulálódnak BCR-en keresztül érkező jelekre, a CREB aktivációt tekintve, tehát alacsonyabb a naív B-sejtek aktivációs küszöbértéke. Ezzel szemben CpG stimulusra a p38 és az Erk az RA betegek memória B-sejtjeiben mind az alapállapothoz, mind az anti-Ig –vel stimulált mintákhoz képest kevésbé aktiválható.

4. A BCR, BR3 ÉS TLR9 RECEPTOROKON TÖRTÉNŐ SIMULÁCIÓ HATÁSÁRA KIALAKULÓ B-SEJT PROLIFERÁCIÓ VIZSGÁLATA EGÉSZSÉGES EGYÉNEK B-SEJTJEIN

A különböző jelpályák között együttműködés funkcionális következményét a B-sejtek szaporodásának összehasonlítása alapján vizsgáltuk egészséges véradók B-sejtjein. A B-sejteket RosetteSep segítségével (StemCell Technology, US) tisztítottuk, a sejtek tisztasága >85% volt. A stimulációt anti-IgG-vel (2.5 µg/ml), emberi rekombináns BAFF fehérjével (100 ng/ml) és emberi TLR9-hez kötődő CpG oligonukleotiddal (4 µg/ml) végeztük. A Tak1 inhibitorát és az inaktív, kontrol inhibitorát 50 pmol/ml koncentrációban alkalmaztuk. A sejteket CFSE festékkel (carboxifluorescein szukcinimidil észter) töltöttük fel és a sejtek osztódásával létrejövő fluoreszcencia csökkenést mértük áramlási citometriával. Az eredményeket a Flow-Joe szoftverrel értékeltük. Az ábra egy tipikus kísérlet eredményét mutatja 3 vizsgálatból. A megfelelő stimulusok jelenlétében 5 napig tenyésztett sejtek fluoreszcencia intenzitása jellegzetesen változott. A kontrol, a BAFF-fal kezelt és az anti-Ig-vel kezelt mintákban elenyésző mennyiségben találtunk osztódó sejteket, míg a CpG kezelt minták kis mértékű sejtszaporodást mutattak. Az anti-Ig-vel és CpG-vel együttesen tenyésztett sejtek ezzel szemben jelentős szaporodást adtak, amit a BAFF jelenléte nem befolyásolt. A CpG és BAFF együttes jelenlétében sem tapasztaltunk jelentős változást, a csak CpG-vel kezelt mintákkal összehasonlítva. A Tak1 inhibitorral kezelt minták elemzése azt mutatta, hogy a Tak1 szükséges a BCR és TLR9 közötti együttműködés eredményeként kialakuló, fokozott szaporodáshoz, az inhibitor csökkentette az osztódó sejtek számarányát (13. ábra).

Meg kell jegyezni, hogy vizsgálatainkban ezen a szinten nem vettük figyelembe más receptorok (pl. CD40) és a citokinek szaporodásra gyakorolt hatását.

Eredményeink azt igazolják, hogy a TLR9-en keresztül érkező jelek, ami *in vivo* körülmények között bakteriális DNS vagy az apoptotikus sejtekből felszabaduló metilálatlan DNS darabok lehetnek, a Tak1-től függő módon váltják ki a szuboptimális BCR jelet kapott sejtek elszaporodását. Ez elősegítheti az antigén által irányított pozitív szelekciós folyamatokat. Korábbi eredményeinkkel összhangban ezek az adatok is a Tak1 potenciális gyógyszer-célpont szerepére hívják fel a figyelmet.

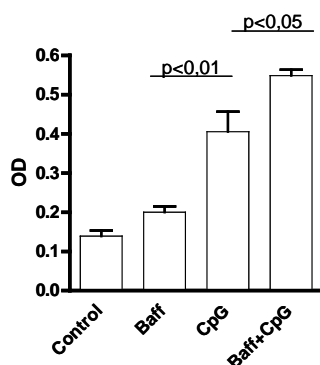


13. Ábra. Tisztított B-sejtek proliferációja BAFF, anti-Ig, CpG és a kombinált stimulusok hatására. CFSE –vel feltöltött sejtek osztódó populációinak mean fluoreszcencia változása az *in vitro* sejtkultúra 5. napján.

5. A BAFF-R ÉS A TLR9 EGYÜTTMŰKÖDÉSE AZ ELLENANYAG VÁLASZ KIVÁLTÁSÁBAN.

Eddigi eredményeink alapján a BAFF tehát nem befolyásolja a proliferációs jeleket, ezzel szemben segíti a sejtek túlélő képességét a halálreceptor, CD95/Fas-indukált apoptotikus jelekkel szemben. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy elősegíti-e a BAFF a CpG által TLR9-en keresztül kiváltott ellenanyagtermelést *in vitro* sejt kultúrában.

A RosetteSep-eljárással tisztított B sejteket BAFF (100ng/ml) és CpG (4 µg/ml) jelenlétében tenyésztettük, majd a hetedik napon mértük az IgG és IgM ellenanyagtermelést ELISA segítségével. A CpG egymagában stimulálta az ellenanyag szintézist és ezt kis mértékben fokozta a BAFF jelenléte (14. ábra). Hasonló eredményeket kaptunk RA betegek B-sejtjeinek vizsgálatakor is.



14. Ábra. *In vitro* IgG+IgM szintézis TLR9-en keresztül történő stimuláció hatására és BAFF jelenlétében.

Eredményeink összesítve azt mutatják, hogy a **TLR9-en keresztül érkező jelek kiváltják az emberi B sejtek aktiválódását, proliferációját és ellenanyag termelését is**, és az első két esetben szinergikus együttműködésben állnak a BCR által kiváltott jelekkel, ami arra utal, hogy a természetes immunválasz TLR9-en keresztül történő aktiválása az antigénre nem specifikus módon sejtproliferációt és ellenanyag termelést válthat ki. Ez fokozott védelmet biztosíthat a fertőző ágensekkel szemben, de fokozhatja az autoreaktív ellenanyagok termelésének veszélyét is.

A pályázat beadásakor terveink között szerepeltek a ko-szignalizáció által kiváltott génexpressziót célzó vizsgálatok is, ezek időközben okafogyottá váltak, mivel több közleményben beszámoltak más szerzők a BAFF és a TLR9 által indukált génekről. Ezek között szerepelnek a B-sejtek aktiválódását és szaporodását szabályozó gének, a MAPK és az NFkB út vonal számos molekulája (Klaschik, Tross et al.; Klinman, Klaschik et al.).

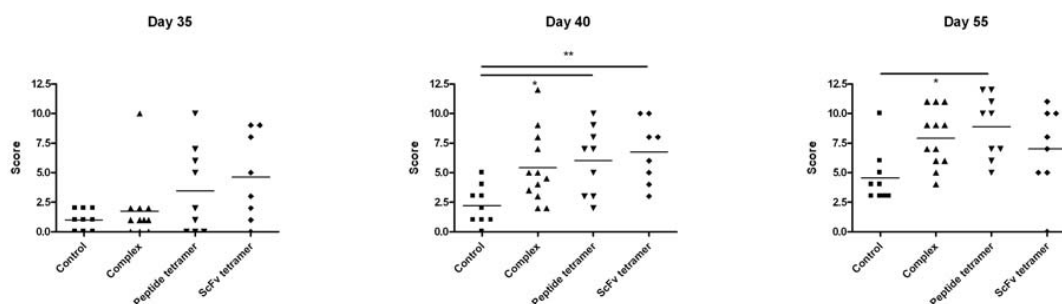
6. VIZSGÁLATOK AZ RA EGÉR MODELLJÉN: A KOLLAGÉN INDUKÁLT ARTRITISZ-BEN (CIA), AZ IGG FC RECEPTOROK SZEREPE

A CIA jó modell az RA-ban lezajló folyamatok tanulmányozására, miután autoantitest termeléssel és gyulladásos ízületi betegséggel jár, és az immunkomplexek kulcsszerepet játszanak a betegség patomechanizmusában, amit az is igazol, hogy ellenanyagokkal ill. immunkomplexekkel a betegség átvihető egyik állatból a másikba. Munkánk során az Fc

receptorok és immunkomplexek szerepét vizsgáltuk az autoantitest termelésre, proinflammatorikus citokinek termelésére és a CIA során kialakuló gyulladásos folyamatokra kollagénnel immunizált DBA/1 egerekben.

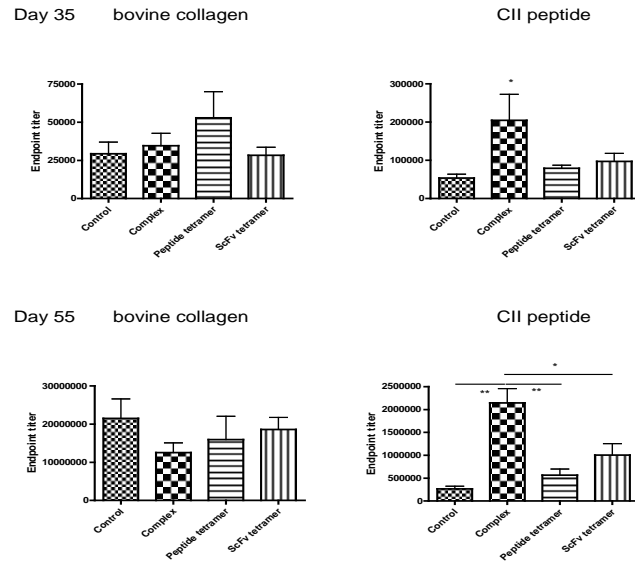
Mesterségesen kialakított komplexek hatását vizsgáltuk a CIA kialakulására, az ellenanyag, citokin és kemokin termelésre. Korábbi eredményeink szerint a BCR-hez és a Fc γ RII/III-hoz kötődő komplexek fokozzák és a várttal ellentétben, nem gátolják a haptén-specifikus ellenanyag termelést (Angyal, Szekeres et al.). Feltételezéseink szerint ennek magyarázata, az hogy az aktiváló Fc γ R működése dominál a gátló, Fc γ RII-vel szemben a humorális válasz immunkomplexek által történő regulációjában.

Jelen vizsgálatainkban alkalmazott komplexek az Fc γ RII/IIIa specifikus monoklonális antitest, a 2.4G2 monoklonális ellenanyag egyláncú variabilis fragmentjéből (scFv) valamint a kollagén módosított artritogén epitópjából álltak. Az 2.4G2 scFv-t monobiotinilált formában állítottuk elő, a kollagén epitóp peptidet biotiniláltuk, majd a két molekulát extravidin segítségével kapcsoltuk össze. A megfelelő (1:4) molekuláris aránynál így 2.4G2 scFv tetramereket, CII-peptid tetramereket, vagy 1:2:2 aránynál az antigén- és Fc-receptorokat felismerő, bispecifikus komplexeket kaptunk. A CIA-t suboptimális körülmények között váltottuk ki, egyszeri bovin kollagén (CII) oltással. Egy hónap elteltével ráoltást végeztünk a fent leírt molekulakonstrukciókkal, és néhány nap múlva vizsgáltuk a betegség kialakulását, és az ellenanyag termelést. Az eredmények azt mutatják, hogy a tetramer peptiddel, vagy 2.4G2 scFv-val való oltás szignifikánsan gyorsította a betegség megjelenését, és a tünetek súlyosságát, amit a lábak kisizületeinek gyulladására adott összesített pontok alapján mértünk. A komplexek szintén emelték a betegségre jellemző pontértékeket.

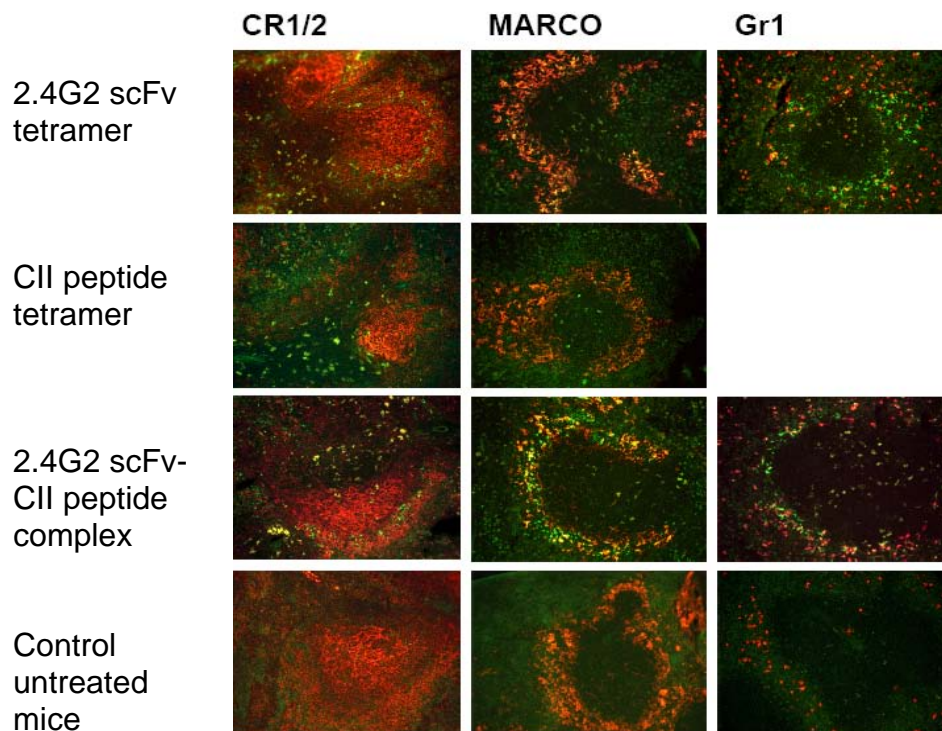


15. Ábra. A CII peptid tetramer és a 2.4G2 scFv tetramer és a kettő komplexe jelentősen gyorsítja a CIA tüneteinek megjelenését, és a betegség súlyosságát. A score értékek az állatok lábaira adott pontok összesített értékét jelentik, a gyulladás erősségének megfelelően 1-3ig pontoztunk lábanként.

Az ellenanyag termelés összehasonlítása a különféleképpen kezelt egerekben azt mutatta, hogy a komplexekkel történt oltás jelentősen emelte a peptid-specifikus, de nem változtatta a kollagén-specifikus IgG szintet. A komplexekkel oltott állatokban jelentős peptid-specifikus ellenanyag termelést tudtunk kimutatni, ami valószínűleg fokozott antigénbemutatás, és/vagy emelkedett citokin termelés eredménye lehet (16. ábra). A peptid-specifikus IgG megjelenése olyan komplexek kialakulását eredményezheti a peptiddel oltott állatokban, amelyek valamennyi Fc γ receptorhoz képesek kötődni.



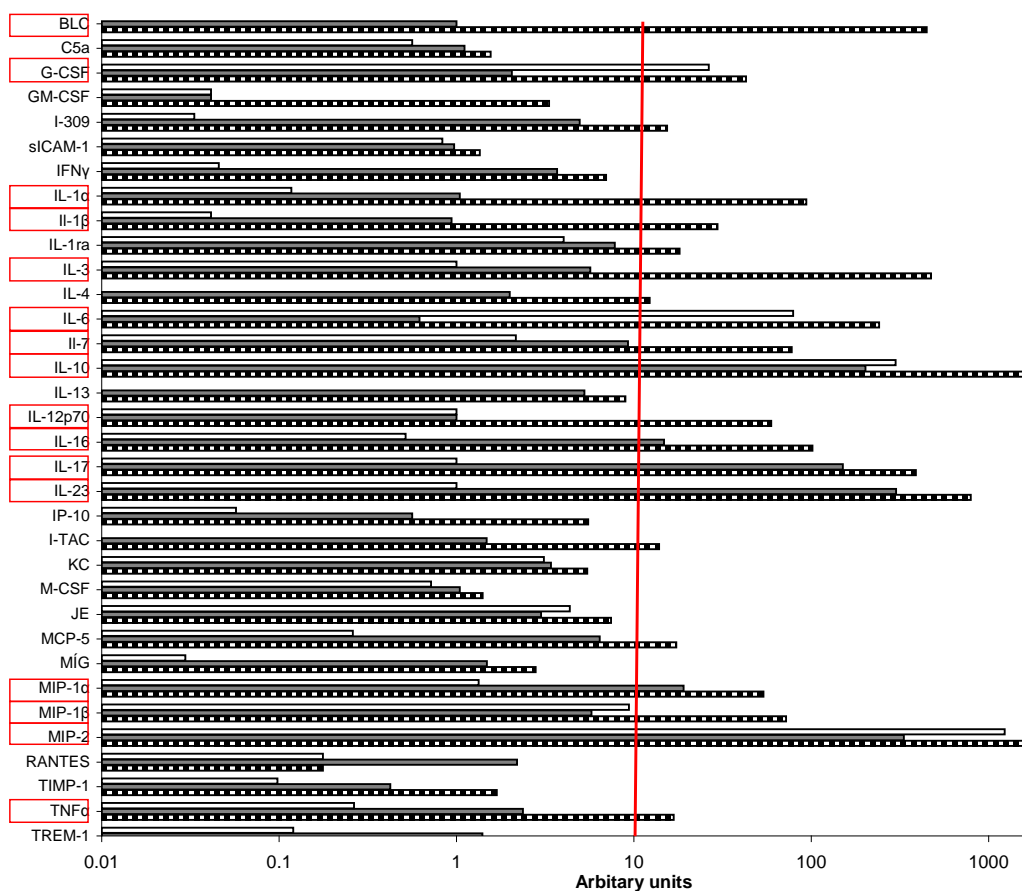
16. Ábra Kollagén-specifikus és CII peptid specifikus ellenanyag termelés a komplexekkel vagy tetramerekkel oltott állatokban. ELISA mérés eredménye, az ábrán 6-8 állat átlagértékeit láthatjuk.



17. Ábra. A komplexek és a teramer konstrukciók kötődése kollagénnel immunizált, majd a megfelelő konstrukciókkal oltott állatok lépsejtjeihez az oltás után 30 perccel. Immunhisztokémiai vizsgálat, piros színnel az egyes markerek festődését, zöld színnel a komplexek ill. tetramer konstrukciók kötődését mutatjuk. A kolokalizációnál sárga szín jelenik meg.

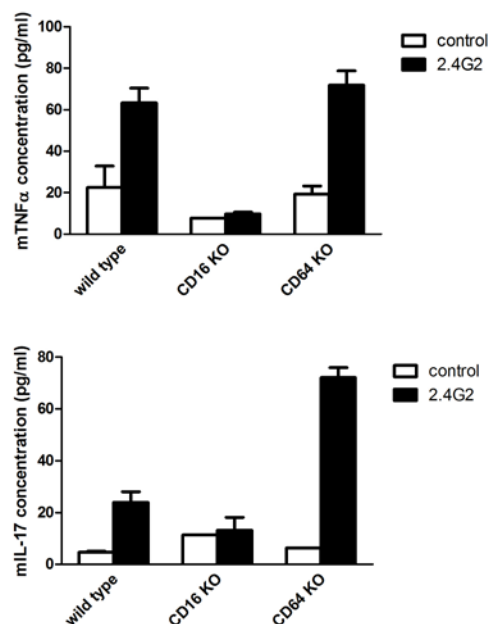
Megvizsgáltuk a molekula konstrukciók lépsejtekhez való kötődő képességét *in vitro* és *in vivo* tesztekben. Legjobban a komplexek kötődtek: kimutattuk jelenlétüket B-sejteken, granulocitákon, dendritikus sejteken és makrofágokon (az áramlási citometriás ábrákat itt hely hiányában nem mutatjuk), továbbá *in vivo* ko-lokalizációjukat dendritikus sejtekkel (CR1/CR2), a marginális zóna makrofágokkal (MARCO), és granulocitákkal (Gr1) (17. ábra). Ezekhez a sejtekhez kötődve a komplexek fokozhatják az antigén bemutatását, miután mind a B-sejtek, mind a makrofágok, dendritikus sejtek és granulociták professzionális antigénbemutató sejtek, és rendelkeznek MHCII-vel és FcγRII/III-mal is.

Így az általunk létrehozott komplexek és molekulakonstrukciók hatását befolyásolhatja az is, hogy az *in vivo* termelődött peptid-specifikus IgG kötődhet a komplexben levő peptidhez, így lehetővé téve nagyobb komplexek létrejöttét, amelyek már nem csak γMIIII -hoz, hanem az FcγRI-hez, vagy akár az FcγRIV -hez is kötődhetnek. A komplexek FcγR-hez való kötődése stimulálhatja különféle citokinek és kemokinek felszabadulását is. Megvizsgáltuk, hogy milyen citokinek és kemokinek termelődhetnek a komplexek hatására *in vitro* és *in vivo* körülmények között az egerekben. Az eredmények azt mutatták, hogy a komplexek IFNγ, TNFα, IL17, IL-10 termelést indukálnak egér lépsejtekből *in vitro*, és további citokinek (G-CSF, IL-1, IL-3, IL-6, IL-12, IL-23) és kemokinek (CXCL13, MIP1 and MIP-2) termelését válthatják ki *in vivo* körülmények között (18. ábra).



18. Ábra. Citokinek és kemokinek termelése a komplexekkel (csíkos oszlop) peptid tetramerekkel (nem kitöltött oszlop) és scFv tetramerekkel (szürke oszlop) oltott, kollagénnel immunizált egerekben. Citokin fehérje microarray vizsgálat eredménye.

A TNF α és az IL-17 termelődését a 2.4G2 scFv tetramer hatására Fc γ RIII KO és Fc γ RI KO egerek esetében is vizsgáljuk. A Fc γ RIII KO egerek esetében nem tudtuk kimutatni (19. ábra), ami arra utal, hogy az Fc γ RIII fontos proinflammatorikus citokin termeléséért. Mindez az immunkomplexek és az Fc γ RIII kulcsszerepére utal a CIA és feltehetően az RA patomechanizmusában.



19. Ábra. Az Fc γ RIII (CD16) és Fc γ RI (CD64) KO egerek TNF α és IL-17 termelésének összehasonlítása 2.4G2 scFv tetramerek hatására.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy modell immunkomplexeink, a 2.4G2 scFv-CII peptid tetramer – mint feltehetőleg *in vivo* körülmények között az IgG immunkomplexek is - a betegség korai fázisában az antigén-specifikus ellenanyag termelés mértékét növelhetik, a fokozott antigén bemutatás következtében, a betegség későbbi szakaszában pedig gyulladásos mediátorok felszabadulását váltják ki, ezeken keresztül hozzájárulnak a patológias folyamatok súlyosbodásához.

Utóbbi eredményeinket beküldtük közlésre az Arthritis Research and Therapy c. folyóiratba. (Eszter Szarka, Zsuzsa Neer, Monika Ádori, Adrienn Angyal, József Prechl, Endre Kiss, Zsuzsa Barad, Dorottya Kövesdi, Péter Balogh, and Gabriella Sármay: Modulation of collagen-induced arthritis by extravidin-linked complexes of the arthritogenic peptide epitope of collagen and the single chain Fv fragment of an Fc γ receptor II/III-specific monoclonal antibody).

Irodalomjegyzék

- Angyal, A., Z. Szekeres, et al. "CD16/32-specific biotinylated 2.4G2 single-chain Fv complexed with avidin-FITC enhances FITC-specific humoral immune response in vivo in a CD16-dependent manner." Int Immunol **22**(2): 71-80.
- Bossen, C. and P. Schneider (2006). "BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling." Semin Immunol **18**(5): 263-75.
- Firestein, G. S. and N. J. Zvaifler (2002). "How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end." Arthritis Rheum **46**(2): 298-308.
- Gabriel, S. E. (2001). "The epidemiology of rheumatoid arthritis." Rheum Dis Clin North Am **27**(2): 269-81.
- Gu, H., R. J. Botelho, et al. (2003). "Critical role for scaffolding adapter Gab2 in Fc gamma R-mediated phagocytosis." J Cell Biol **161**(6): 1151-61.
- Klaschik, S., D. Tross, et al. "Short- and long-term changes in gene expression mediated by the activation of TLR9." Mol Immunol **47**(6): 1317-24.
- Klinman, D. M., S. Klaschik, et al. "Immunostimulatory CpG oligonucleotides: Effect on gene expression and utility as vaccine adjuvants." Vaccine **28**(8): 1919-23.
- Kurokawa, M. and S. Kornbluth (2009). "Caspases and kinases in a death grip." Cell **138**(5): 838-54.
- Rodrigues, G. A., M. Falasca, et al. (2000). "A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling." Mol Cell Biol **20**(4): 1448-59.
- Shi, Z. Q., D. H. Yu, et al. (2000). "Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity." Mol Cell Biol **20**(5): 1526-36.